

Efeitos da paisagem de campo e florestamento com *Pinus* na diversidade e estrutura genética de pequenas populações remanescentes de *Araucaria angustifolia*Effects of natural field landscapes and *Pinus* plantations in diversity and genetic structure of small remnants populations of *Araucaria angustifolia*Newton Clóvis Freitas da Costa<sup>1</sup>, Altamir Frederico Guidolin<sup>2</sup>,  
Oiéler Felipe Vargas<sup>3</sup> e Adelar Mantovani<sup>4</sup>**Resumo**

Características da paisagem podem estruturar a variação genética e afetar o fluxo de pólen de populações de plantas. Para investigar os efeitos da paisagem de campo e florestamento com *Pinus* na estrutura e diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia*, utilizaram-se oito locos microssatélites para análise de 400 sementes e 87 indivíduos reprodutivos, presentes em quatro remanescentes florestais (Capões). Os capões estudados estão inseridos em diferentes matrizes de paisagem, dois em campo natural (Fazenda X) e dois em florestamento com *Pinus* (Fazenda Z). Elevada diversidade genética foi verificada nas populações (He, variando de 0,16 a 0,829), sem diferenças significativas entre os indivíduos adultos. Não foram verificadas diferenças pelo coeficiente de coancestralidade entre as fazendas ( $F_{FA} = 0.002$ ,  $P > 0,05$ ). Esses resultados sugerem que existiu uma conectividade histórica entre os locais. Índices de fixação significativos foram verificados nas sementes da Fazenda Z ( $F = 0,076$ ,  $P < 0,05$ ) e no conjunto total de sementes analisadas ( $F = 0,052$ ,  $P < 0,05$ ), indicando fixação para alguns alelos, possivelmente pelo cruzamento entre aparentados. A divergência genética verificada entre populações de adultos e de sementes ( $F_{AS} = 0,029$ ,  $P < 0,05$ ) aliado com a ocorrência de alelos exclusivos em todas as populações, sugere que nem toda variabilidade genética dos indivíduos adultos analisados está sendo passada para as sementes, especialmente na Fazenda Z. Por outro lado, houve contribuição para polinização das sementes vindo de fora dos capões, em ambas as fazendas.

**Palavras-chave:** Plantios florestais, pequenos capões, divergência genética, índice de fixação.

**Abstract**

Landscape characteristics may structure genetic variation and affect the pollen flow of plant populations. To investigate the effects of field landscapes and *Pinus* plantations on genetic diversity and the structure of *Araucaria angustifolia* populations, eight microsatellite loci were used to analyze 400 seeds and 87 reproductive trees, present in four forest remnants (Patches). The studied patches are inserted into different landscape matrices, two in natural field (Farm X) and two in *Pinus* forestation (Farm Z). The analysis showed high population genetic diversity (He, ranged from 0.16 to 0.83) with no significant difference among adults. No differences between farms were verified by co-ancestry coefficient ( $F_{FA} = 0.002$ ,  $P > 0.05$ ). These results suggest that there was a historical connectivity between the locations. Significant fixation indices were detected in seeds from Farm Z ( $F = 0.076$ ,  $P < 0.05$ ) and in the total analyzed seeds ( $F = 0.052$ ,  $P < 0.05$ ), indicating allele fixation, possibly by crossing among relatives. The genetic divergence observed among adults and seed populations ( $F_{AS} = 0.029$ ,  $P < 0.05$ ) coupled with the presence of unique alleles in all populations, suggest that not all the genetic variability of the analyzed adults is being passed on to the seeds, especially in Farm Z. On the other hand, there was an important pollen contribution from outside patches for seed formation, in both farms.

**Keywords:** Forest plantations, small patches, genetic divergence, fixation index.

<sup>1</sup>Mestre em Engenharia Florestal. UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina. Av. Luiz de Camões, 2090 - Bairro Conta Dinheiro - 88520-000, Lages, SC. E-mail: [newtoncfc@gmail.com](mailto:newtoncfc@gmail.com)

<sup>2</sup>Professor Doutor do Departamento de Agronomia. UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina. Av. Camões 2090 - 88520-000 - Lages, SC. E-mail: [altamir.guidolin@udesc.br](mailto:altamir.guidolin@udesc.br)

<sup>3</sup>Graduando em Engenharia Florestal. UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina. Av. Luiz de Camões, 2090 - Bairro Conta Dinheiro - 88520-000, Lages, SC. E-mail: [oielerfelipe@gmail.com](mailto:oielerfelipe@gmail.com)

<sup>4</sup>Professor Doutor do Departamento de Engenharia Florestal. Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal. UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina. Av. Luiz de Camões, 2090 - Bairro Conta Dinheiro - 88520-000, Lages, SC. E-mail: [oielerfelipe@gmail.com](mailto:oielerfelipe@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

Características da paisagem podem estruturar a variação genética dentro e entre as populações, bem como influenciar nos processos genéticos evolutivos como fluxo gênico, deriva genética e seleção (MANEL et al., 2003). Tais processos podem ser afetados pelo isolamento de populações de espécies arbóreas em pequenos fragmentos, reduzindo o número de indivíduos reprodutivos e a densidade populacional (YOUNG; BOYLE, 2000). Espécies isoladas em pequenos fragmentos que não forem capazes de manter o fluxo através da porção não florestal da paisagem, poderão limitar sua ocorrência e, por consequência reduzir a probabilidade de persistência da população (FAHRIG, 2003).

A dispersão por pólen, por sua vez, possui o potencial de transportar gametas masculinos a longas distâncias, contrapondo efeitos do “isolamento” de genes em populações espacialmente isoladas (ENNOS, 1994). Para isso, é preciso que se mantenha na paisagem fragmentada pequenos remanescentes e árvores isoladas, afim de promoverem o fluxo de pólen (BITTENCOURT; SEBBENN 2007, 2009). Entretanto, além do isolamento por distância decorrente da fragmentação, alterações antrópicas podem também causar isolamento pela formação de barreiras ao fluxo de pólen de populações naturais.

Um exemplo disso é a paisagem sul brasileira, caracterizada por mosaicos de Campos e Floresta com Araucária (BEHLING et al., 2004), que hoje se encontra sob forte pressão de uso, onde vastas áreas de campo estão sendo substituídas por florestamentos com *Pinus* e *Eucalyptus* (BEHLING et al., 2009). A remoção da floresta e a alteração da paisagem natural, por meio da agricultura, pastoreio e reflorestamento com espécies exóticas, têm mudado claramente a vegetação original desta região (BEHLING et al., 2009).

Conhecer as repostas as alterações de habitats em populações de espécies chaves é fundamental para conservação da biodiversidade de paisagens fragmentadas (HANSON et al., 2008). Deste modo, a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, na paisagem em que está inserida, apresenta uma enorme importância, tanto pelo potencial econômico quanto ecológico, sendo considerada como uma espécie determinante da formação Floresta Ombrófila Mista, também chamada de Floresta com Araucária.

*Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) é uma conífera, dioica, polinizada pelo vento que

ocorre comumente em contínuos florestais e em remanescentes em meio a paisagem campo (Capões). Apresenta papel fundamental desde a colonização até o dossel da floresta, fornecendo grande quantidade de recursos que contribuem para sobrevivência de muitas outras espécies (PINHEIRO; GANADE, 2009), inclusive o homem.

Condições naturais da Floresta com Araucária podem dificultar a movimentação do pólen da *A. angustifolia* devido a barreiras físicas formadas pela alta densidade vegetal dessas formações (SOUSA; HATTEMER, 2003). Porém, áreas originalmente de campo substituídas por plantios florestais implicam na formação de barreiras físicas com densidades vegetais superiores a enfrentada naturalmente pela espécie.

Neste cenário, o objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de adultos e sementes de *A. angustifolia* inseridos em diferentes matrizes de paisagens (campo e florestamento com *Pinus*), a fim de investigar como a variabilidade genética está distribuída nas populações destes diferentes ambientes. As seguintes questões foram abordadas: (1) O florestamento com *Pinus* circundando os capões com Araucária afetam a chegada de alelos via fluxo de pólen e, conseqüentemente, causam redução na diversidade e aumento na diferenciação genética destas populações em comparação com as populações remanescentes em campo? (2) Em função da barreira formada pelos plantios de *Pinus* há um aumento da endogamia na nova geração (sementes) de *Araucaria angustifolia*?

## MATERIAL E MÉTODOS

### Áreas de estudo e amostragem

As áreas de estudo estão localizadas na região serrana de Santa Catarina, no município de Lages, que possui elevação média de 950 m. O clima da região, segundo a classificação Köppen, é do tipo Cfb (Clima mesotérmico subtropical úmido com verões frescos, sem estação seca e com ocorrência de geadas severas), com precipitação média anual de 1200 mm e temperaturas oscilando entre -7°C a 35°C e médias de 16°C (KLAUBERG et al., 2010).

O estudo envolveu dois ambientes compostos por diferentes matrizes de paisagem: o primeiro ambiente representa a matriz de paisagem plantios florestais, onde os fragmentos com Araucária (Capões) se encontram em meio a plantios de *Pinus*; e o segundo representa a matriz de paisagem campos, em que os capões

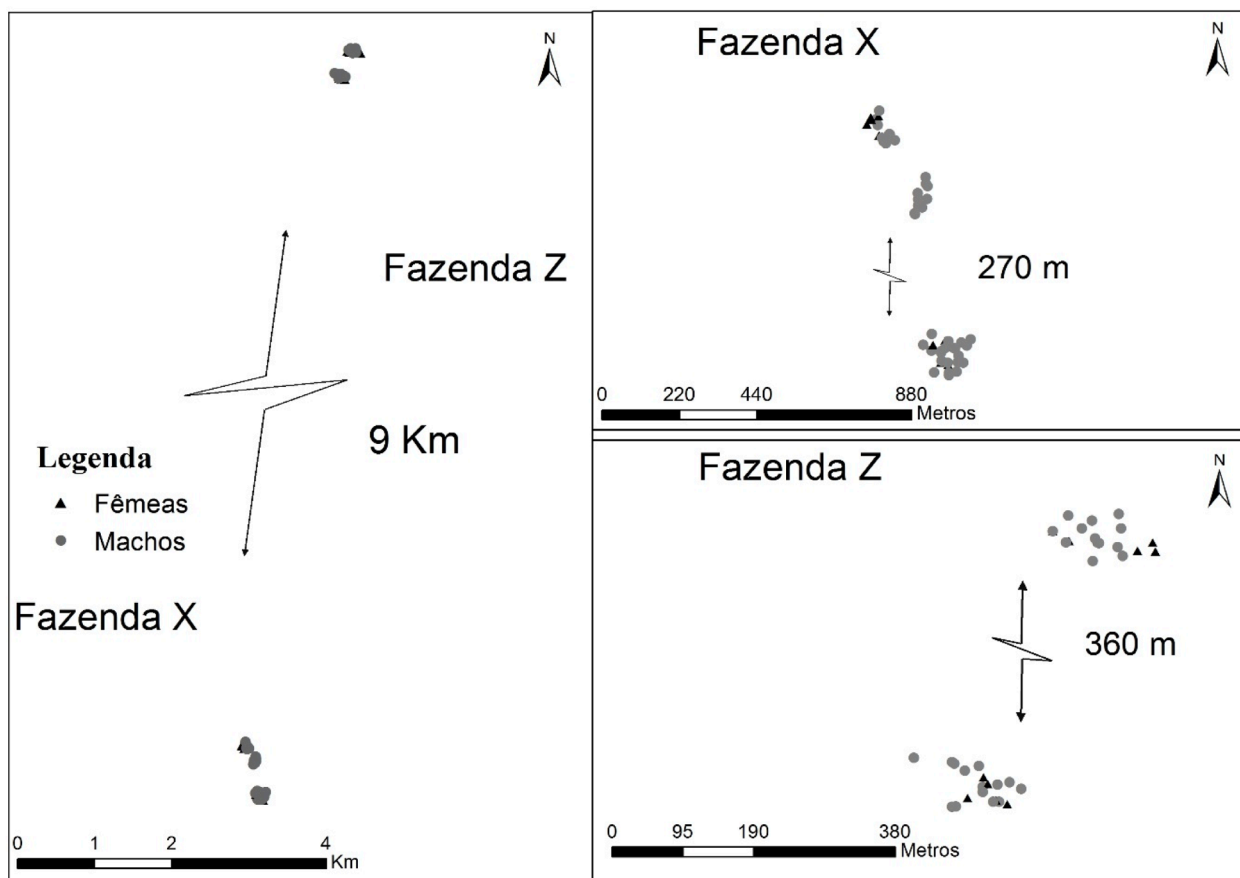
com Araucária estão presentes em áreas de campos naturais. As coletas para análise de DNA contemplaram 400 sementes e 87 indivíduos adultos reprodutivos, presentes em quatro capões, dois inseridos na área de campos naturais, denominados Capão A e Capão B, localizados na Fazenda Cruz de Malta (Fazenda X), e dois entremeados com plantios de *Pinus*, denominados Capão C e Capão D, localizados na Fazenda Espigão (Fazenda Z). A fazenda Cruz de Malta (27°46' S e 50°20' W), apresenta histórico de uso com pecuária extensiva e a fazenda Espigão (27°50 S e 50°22 W), possui seu histórico de uso na pecuária extensiva e conversão para silvicultura de *Pinus* na metade da década de 1960. As distâncias médias são de 9000 m entre fazendas, 360 m entre os capões A e B e 270 m entre os capões C e D, (Figura 1).

Todos os indivíduos de *A. angustifolia* com diâmetro à altura do peito (DAP) acima de 20 cm foram mapeados e identificados quanto ao sexo. Para a coleta das sementes, foram selecionadas cinco árvores matrizes por capão, das quais coletou-se cinco pinhas cada, e de cada uma destas pinhas foram retiradas quatro sementes, o que equivale a 20 sementes, conside-

radas meias-irmãs, por matriz. Foram coletadas amostras foliares individualizadas (acículas), de cada planta matriz e de todos os indivíduos machos reprodutivos de cada capão.

### Amplificação dos microssatélites e genotipagem

Para a extração do DNA, foram utilizados cerca de 150 mg de acículas para os adultos e o eixo embrionário inteiro para as sementes. O DNA genômico total foi extraído usando o método de Mazza e Bittencourt (2000), com adaptações realizadas para extração de DNA das sementes. A amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada utilizando os locos Ag23, Ag45, Ag20, Ag56, Ag94, desenvolvidos por Salgueiro et al. (2005), CRCAc1 e CRCAc2 desenvolvidos por Scott et al. (2003) e Aang24 desenvolvido por Schmidt et al. (2007). As temperaturas de anelamento ( $T_a$  °C) foram otimizadas para quatro reações biplex: Biplex 1 (Ag94 e Aang24;  $T_a$  = 55 °C); Biplex 2 (Ag23 e Ag45;  $T_a$  = 56 °C); Biplex 3 (Ag20 e Ag56;  $T_a$  = 60 °C); Biplex 4 (CRCAc1 e CRCAc2;  $T_a$  = 54 °C). Para amplificação das amostras foi utilizada uma reação contendo 30 ng de DNA, 0,2 µM de cada primer,



**Figura 1.** Distribuição espacial dos indivíduos de *Araucaria angustifolia* nos capões em paisagem de campo (Fazenda X), e em paisagem de plantio de *Pinus* (Fazenda Z).

**Figure 1.** Spatial distribution of the *Araucaria angustifolia* individuals in the patches in natural field landscapes (Farm X), and in *Pinus* planting (Farm Z).

0,2 mM de DNTP, 1x Tampão, 1,5 mM Cloreto de Magnésio, 0,8 U de Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para um volume final de 15 µL. Foi utilizado um termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler para realização da PCR da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 30 ciclos com as etapas de desnaturação a 94°C por 45 s,  $T_a$  °C por 45 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final: Biplax 1 e 2 a 72°C por 7 min; e Biplax 3 e 4 a 60°C por 60 s. Para genotipagem de cada amostra foi feita uma reação com 1,2 µL de produto da PCR, 0,4 µL de GS600 LIZ® e 8,6 µL de formamida HI-DI™, com realização da eletroforese capilar em um Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos (alelos) de cada reação biplex foi determinado por interpretação dos picos de fluorescência gerados nos eletroferogramas por meio do software GeneMapper v.3.2 (Applied Biosystems). Todos esses procedimentos foram desenvolvidos no Laboratório DNA UDESC na Universidade do Estado de Santa Catarina.

### Análise dos dados

A diversidade genética para cada população foi caracterizada pela riqueza alélica ( $R$ ), número médio de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), e heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ). Os níveis de endogamia para cada uma das populações foram estimados pelos valores de  $F$ , calculados pela expressão  $\hat{F} = 1 - (\hat{H}_o / \hat{H}_e)$  (Nei, 1978). A significância dos valores de  $F$  foi obtida pelos intervalos de confiança (95%) calculados por meio de *bootstrap* com 1000 permutações e o erro padrão (EP) das estimativas foi estimado por *Jackknife* entre os locos, com 1000 repetições. A fim de investigar diferenças nos níveis de diversidade genética ( $R$ ,  $H_o$  e  $H_e$ ) entre populações, comparações aos pares foram realizadas por meio do teste unilateral descrito por Goudet (2002), com significância testada por permutação, com 1000 repetições. Todas essas análises foram feitas com auxílio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

Para avaliar o efeito da barreira causada pelos plantios de *Pinus* nas frequências alélicas das populações estimou-se as estatísticas  $F$  de Wright por meio dos coeficientes de coancestralidade de Weir e Cockerham (1984), para quatro níveis hierárquicos de subdivisão. O índice de fixação da população total ( $F_{IT}$ ) foi então particionado em componentes para verificar a variação gené-

tica dentro das subpopulações locais ( $F_{IS}$ ) e entre as subdivisões das populações, comparado entre Adultos e Sementes ( $F_{AS}$ ), entre Fazendas ( $F_{FA}$ ) e entre Capões ( $F_{CA}$ ). Foram obtidos os intervalos de confiança (IC) para as estimativas, com significância a 95%, por meio de reamostragens *bootstrap* entre locos, utilizando 1000 permutações. Essas análises foram realizadas com auxílio do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 1999).

## RESULTADOS

### Diversidade genética

O número de indivíduos machos reprodutivos presentes nos capões foi de 16 para o capão A, 21 para o B, 14 para o C, e 13 para o capão D. Os resultados encontrados para as estimativas da diversidade genética pela análise de oito locos microssatélites estão sumarizados na Tabela 1. Dos 484 indivíduos amostrados, (adultos e sementes), realizou-se a genotipagem para 480 indivíduos, que foi caracterizada por 477 genótipos diferentes, ou seja, houveram três genótipos representados por dois indivíduos. O número total de alelos foi de 89, com número médio de alelos por loco de 11,1, oscilando de quatro (Ag45) a 21 (Ag20). A Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou entre locos de 0,165 a 0,829 com média de 0,674, a Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,178 a 0,877 com média de 0,661, e o índice de fixação para cada loco variou de -0,034 a 0,105 com média de 0,052.

O índice de fixação ( $F$ ) foi positivo e significativamente diferente de zero ( $P < 0,01$ ) para população de sementes amostradas na Fazenda Z (florestamento com *Pinus*), com valor de  $F = 0,076$  (IC a 95% = 0,031-0,135), para o conjunto total de sementes amostradas ( $F = 0,062$ ; IC a 95% = 0,026-0,104) e para população total que apresentou valor de  $F$  de 0,052 (IC a 95% = 0,011-0,104) (Tabela 1). Entretanto, a população de sementes amostradas na Fazenda X (campo natural) e as demais populações de adultos não apresentaram valores de  $F$  significativamente diferente de zero.

Foram verificadas diferenças não significativas de diversidade genética para  $\hat{R}$ ,  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ , nas populações de adultos das fazendas X e Z, nas populações de adultos e de sementes da Fazenda X, e nas populações de sementes das fazendas X e Z (Tabela 1). Porém, houve diferença significativa para os valores de  $\hat{R}$  ( $p = 0,036$ ),  $\hat{H}_o$  ( $p = 0,014$ ) e  $\hat{H}_e$  ( $p = 0,025$ ) entre as populações de adultos e a de sementes da Fazenda Z,

em que a população das sementes apresentou menores índices de  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ , e maior  $\hat{R}$ .

Das populações analisadas, o número de alelos encontrados foi menor para população de indivíduos adultos do Capão D (51 alelos) e maior para a população de sementes do Capão B (68 alelos). Foram encontrados 21 alelos exclusivos em todas as populações analisadas (Tabela 2), sendo que estes estão presentes em maior número nas populações de indivíduos adultos (13) do que nas populações de sementes (8), de ambas as fazendas analisadas. A presença de alelos exclusivos, verificada nos capões de cada fazenda mostra que as populações inseridas em

área de campo natural possuem menor número de alelos exclusivos (8), do que as populações em área de florestamento com *Pinus* (13).

### Estrutura e organização da variação genética

O resultado da estrutura genética das populações analisada de forma hierarquizada apresentou índice de fixação da população total  $F_{IT}$  próximo de 5% e significativamente diferente de zero (Tabela 3). A análise revelou que o índice de fixação dentro da população  $F_{IS}$ , não foi significativo, e que entre as populações os coeficientes de coancestralidade foram

**Tabela 1.** Índices de diversidade genética de adultos e sementes de *Araucaria angustifolia* presentes em paisagens de campo natural e florestamento com *Pinus*.

**Table 1.** Genetic diversity index in adults and seeds of *Araucaria angustifolia* present in natural field landscapes and *Pinus* plantations.

População	n	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}(EP)$
Fazenda X - adultos	47	7,1a	0,669a	0,684a	0,03(0,035)
Fazenda X - sementes	198	8,63ab	0,646ab	0,662ab	0,048(0,022)
Fazenda Z - adultos	37	6,8a	0,694a	0,691a	0,003(0,027)
Fazenda Z - sementes	198	7,86b	0,637b	0,661b	0,076(0,03)*
Média - adultos	84	6,96A	0,681A	0,687A	0,02(0,023)
Média - sementes	396	8,79B	0,641B	0,661B	0,062(0,022)*
Total	480	6,79	0,661	0,674	0,052(0,021)*

n, tamanho da amostra;  $\hat{R}$ , riqueza alélica com base em um número mínimo de 19 indivíduos;  $\hat{H}_o$ , heterozigosidade observada;  $\hat{H}_e$ , heterozigosidade esperada;  $\hat{F}$ , índice de fixação (erro padrão); Letras minúsculas são comparações feitas aos pares entre as populações; letras maiúsculas são comparações entre o conjunto de adultos e sementes; letras diferentes indicam diferenças significativas nas comparações \*( $p < 0,01$ ).

**Tabela 2.** Número de alelos total e exclusivos em populações de adultos e sementes de *Araucaria angustifolia* presentes em pequenos capões sob diferentes paisagens.

**Table 2.** Total and unique alleles in adults and seeds of *Araucaria angustifolia* populations present in small patches under different landscapes.

População	n	Número de alelos	Alelos exclusivos
Capão A - adultos	21	56	3
Capão A - sementes	100	61	2
Capão B - adultos	26	59	2
Capão B - sementes	98	68	1
Capão C - adultos	19	54	2
Capão C - sementes	100	53	2
Capão D - adultos	18	51	6
Capão D - sementes	98	67	3
Total	480	89	21

n, número de indivíduos; Capões A e B (campo); Capões C e D (plântio de *Pinus*).

**Tabela 3.** Estatísticas F obtidas pelos coeficientes de coancestralidade para oito locos microssatélites em populações de *Araucaria angustifolia*.

**Table 3.** F statistics obtained by the co-ancestry coefficients for eight microsatellite loci in *Araucaria angustifolia* populations.

Locos	$F_{IT}$	$F_{IS}$	$F_{FA}$	$F_{CA}$	$F_{AS}$
Ag23	0,142	0,108	-0,021	0,033	0,037
Ag45	0,082	0,071	0,011	0,02	0,012
Ag20	0,035	-0,01	0,016	0,046	0,044
Ag56	0,024	-0,002	0,021	0,031	0,025
Ag94	0,046	0,018	-0,003	0,019	0,028
Aang24	-0,009	-0,034	0,002	0,025	0,024
CRCAc1	0,024	-0,021	0,012	0,042	0,044
CRCAc2	0,09	0,067	-0,009	0,031	0,024
Média	0,054*	0,026	0,002	0,03*	0,029*
IC (95%)	0,022-0,093	-0,009-0,064	-0,008-0,012	0,024-0,036	0,023-0,036

Estimativas do índice de fixação da população total ( $F_{IT}$ ) e dentro das subpopulações locais ( $F_{IS}$ ); Coeficientes de coancestralidade entre Adultos e Sementes ( $F_{AS}$ ), entre Capões ( $F_{CA}$ ) e entre Fazendas ( $F_{FA}$ ); Intervalo de Confiança (IC); \*( $p < 0,05$ ).

significativos na comparação entre capões ( $F_{CA}$ ) e entre gerações de adultos e sementes ( $F_{AS}$ ), sugerindo divergência genética. Entretanto, não foi detectado divergência genética na comparação entre fazendas, pois o valor de  $F_{FA}$  não foi significativamente diferente de zero.

## DISCUSSÃO

### Diversidade genética

As populações estudadas de *Araucaria angustifolia* apresentaram índices elevados de diversidade genética, com Heterozigosidade esperada ( $He = 0,674$ ) semelhante a outros estudos com a espécie (CRISTOFOLINI, 2013,  $He = 0,596$ ; SANT'ANNA et al., 2013,  $He = 0,639$ ). Os resultados encontrados indicam que a população adulta não difere entre fazendas em termos de diversidade genética, sugerindo que estas populações são oriundas do acúmulo de vários eventos de reprodução e dispersão, bem como da sobreposição de gerações. A longevidade de espécies florestais favorece a manutenção da diversidade por um longo período, mesmo depois da exploração/fragmentação, conforme mencionado por Nason e Hamrick (1997) e Hamrick (2004). Assim, é confirmado que populações remanescentes de *A. angustifolia* contém ampla diversidade genética apesar desta representar somente uma pequena fração das populações outrora existentes (STEFENON et al., 2007; AULER et al., 2002; SOUZA et al., 2009)

Segundo Carvalho (2010) a Araucária foi intensamente explorada no século passado, com auge nas décadas de 1940 e 1950, o que reduziu o tamanho das populações e, conseqüentemente, a diversidade genética. A diferença verificada dos índices de diversidade genética entre adultos e sementes (Tabela 1), pode ser um efeito da diminuição do número de indivíduos que estão se reproduzindo nas populações remanescentes em relação às populações originais. Ou pelo fato de que nem todos os indivíduos adultos reprodutivos podem ter sido representados na amostra de sementes. No entanto, resultados semelhantes para a diversidade genética de adultos e progênies de *A. angustifolia* foram encontrados por Sant'Anna et al. (2013). A análise da diversidade das sementes refere-se apenas ao fluxo realizado de pólen de um único evento reprodutivo, mas que traz informações substanciais sobre o quanto do *pool* gênico das populações atuais pode ser transmitido para as próximas gerações.

A riqueza alélica significativamente menor nos indivíduos adultos em relação as sementes, pode ser explicada pelo menor número de indivíduos amostrados. Isto pode ter ocorrido na população adulta do Capão D (Tabela 2), a qual apresentou menor número de alelos encontrados. Entretanto, a quantidade maior de alelos presente nas sementes do que na população adulta do Capão D, sugere que alguns alelos podem ser oriundos de indivíduos reprodutivos localizados fora dos capões analisados. Aliado a isso, a presença de alelos exclusivos em todas as populações analisadas sugere duas hipóteses: a primeira, é que nem todos os alelos presentes nos indivíduos reprodutivos foram passados para as sementes analisadas, sugerindo deriva genética no processo de reprodução; a segunda é que os alelos exclusivos encontrados nas sementes são oriundos de fluxo gênico externo ou de processos de mutação, onde ambos podem, de certa forma contrapor processos de deriva genética. Sendo esses fatores muito importantes para manutenção da espécie, pois os capões estudados apresentam um número de indivíduos reprodutivos consideravelmente baixo para evitar, por si só os efeitos genéticos negativos de populações pequenas (Tabela 2). Segundo Bittencourt e Sebbenn (2007), para *A. angustifolia* esse número seria insuficiente para manutenção da população por um longo período sem que tenha o efeito da endogamia. Contudo, para a espécie o fluxo gênico é capaz de aumentar o número efetivo da população e ajudar a manter a coesão genética entre os fragmentos, minimizando os efeitos da endogamia.

Teoricamente, espera-se níveis de endogamia baixos para espécies dioicas (WAYCOTT et al., 1996). Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho mostraram, em geral, índices de fixação baixos, de acordo com o esperado para a espécie, porém significativos para alguns casos, sugerindo endogamia. Embora valores de  $F$  não significativos em populações naturais de Araucária foram encontrados nos estudos de Mantovani et al. (2006) e Patreze e Tsai (2010), valores significativos foram relatados nos estudos de Auler et al. (2002), Stefenon et al. (2007), Bittencourt e Sebbenn (2009) e Sant'Anna et al. (2013). Estudos com demais espécies dioicas como *Araucaria nemorosa* e *A. columnaris* também apresentaram valores de  $F$  significativos (KATTLE et al., 2007), assim como *Myracrodruon urundeuwa*, que apresentou valores de  $F$  baixos porém significativos (GAINO et al 2010).

O índice de fixação esperado para sementes coletadas de uma única matriz é de no mínimo 0,125, por se tratar de indivíduos meio irmãos. No entanto, o conjunto de sementes coletadas das 20 matrizes apresentou valor de  $F$  de 0,062, metade do valor encontrado em indivíduos meio irmãos. Isso indica que no evento reprodutivo ocorreram cruzamentos com diferentes doadores de pólen, ou seja, apesar de existirem sementes com alto grau de endogamia, meio irmãos e irmãos completos, há também a presença de sementes com baixos níveis de parentesco, possivelmente por serem oriundas de pais com diferentes genótipos. O que permitiu que o índice de fixação não fosse tão elevado quanto ao de indivíduos meio irmãos. Índices de endogamia não tão elevados para um conjunto de sementes de *A. angustifolia* foram também encontrados por Cristofolini (2013).

O índice de fixação não significativo encontrado para as sementes amostradas nos capões em área de campo natural (Fazenda X), indica baixa endogamia na formação das sementes, e que estas possuem uma heterogeneidade genética oriunda possivelmente de um elevado fluxo de pólen, assim como resultados encontrados por Bittencourt e Sebbenn (2009). O que torna essas populações aptas para coleta de sementes, visando a conservação e o melhoramento dos recursos genéticos da espécie. O conjunto de sementes amostradas na área de florestamento com *Pinus* (Fazenda Z), por sua vez, apresentou índice de fixação significativo, com valor em torno de 7%, o que sugere a presença de endogamia, possivelmente causado por um menor fluxo de pólen. Isso pode ser um indício de que o florestamento com *Pinus* forma uma barreira ao fluxo de pólen, porém, não o impede, mas diminui a migração de alelos entre os fragmentos. Deve-se levar em conta que esse efeito pode ter ocorrido devido a características do local e que se referem ao evento reprodutivo apenas de um ano.

É importante salientar que, apesar de haver um indício de uma barreira ao fluxo de pólen formada pelos florestamentos com *Pinus*, as populações desta área não apresentam elevados níveis de endogamia, sugerindo que os mecanismos de fluxo gênico da espécie estão sendo capazes de manter consideráveis níveis de diversidade genética na população. Atribuindo-se ao fato da espécie se reproduzir por vários anos, ocupar o dossel das florestas e principalmente pelo pólen atingir longas distâncias (BITTENCOURT; SEBBENN 2007).

## Estrutura e organização da variação genética

A presença de divergência genética entre capões e entre adultos e sementes (Tabela 3), é consistente com os resultados encontrados nas comparações da diversidade genética, indicando que a variação genética difere tanto entre as populações dos capões quanto para as populações de adultos e sementes. Sant'Anna et al. (2013) também encontraram divergência genética entre adultos e sementes da espécie. Diferenças entre gerações em populações de espécies florestais são encontradas em estudos com *Copaifera langsdorffii* (SEBBENN et al., 2011), *Araucaria nemorosa* e *A. columnaris* (KATTLE et al., 2007). A amostra da população reprodutiva e sua descendência, permitiu inferir que essas divergências genéticas foram originadas principalmente pelo fluxo realizado de pólen, e que as eventuais divergências podem estar ocorrendo pela baixa taxa de troca de pólen entre indivíduos reprodutivos dentro dos capões, ou pela elevada taxa de imigração de pólen.

A estimação dos coeficientes de coancestralidade permitiu avaliar a estrutura genética em diferentes níveis da população total, dessa forma, foi possível verificar que a presença dos plantios de *Pinus* não foi suficiente para que se fixassem divergências genéticas entre as fazendas (Tabela 3). Todavia, os plantios florestais iniciaram nos últimos 50 anos, período em que a *Araucaria angustifolia* tinha uma distribuição natural contínua na região (KLEIN, 1960; REITZ; KLEIN, 1966), permitindo que houvesse uma conectividade entre as áreas. Segundo Kramer et al. (2008) a baixa divergência genética entre populações pode ocorrer se longas distâncias forem alcançadas na dispersão de pólen. O fato das áreas estarem próximas em uma escala de ocorrência da espécie, cerca de 9000 m, permitiu que as comparações entre as fazendas fossem feitas evitando-se o viés de características de ambientes diferentes, uma vez que diferenças para a população adulta não foram detectadas tanto por meio dos índices de diversidade quanto pela divergência genética entre fazendas.

Alguns estudos de estrutura genética com espécies florestais como *A. angustifolia* (AULER et al., 2002; STEFENON et al., 2007; SOUZA et al., 2009), *Dalbergia nigra* (RESENDE et al., 2011) e *Euterpe edulis* (CONTE et al., 2008) encontraram que a maior parte da variabilidade genética está distribuída dentro das populações. Esses resultados convergem com o presente estudo ao verifi-

car que houve uma ausência de estrutura genética entre fazendas, entretanto, divergem ao verificar que a maior parte da variação foi verificada entre os capões. No entanto, isso pode ter ocorrido por considerar-se cada capão como sendo uma população. Porém as distâncias verificadas entre um capão e outro, para cada fazenda, são menores do que as distâncias em que comumente verifica-se o alcance do fluxo gênico para *A. angustifolia* (287 m, BITTENCOURT; SEBBENN 2007; 325 m, SANT'ANNA et al. 2013; 334 m, CRISTOFOLINI, 2013). Desse modo, sugere-se que os diferentes capões, dentro de cada fazenda, representem apenas subdivisões de uma população.

Sugere-se como estratégia de conservação das populações em meio aos plantios florestais a manutenção da vegetação natural dos capões e a conectividade genética entre eles, que pode ser caracterizada por uma rede de fragmentos próximos (capões ou árvores sozinhas). Pois importantes informações acerca do fluxo gênico via pólen (BURCZYK et al., 2004; SMOUSE; SORK, 2004; ROBLEDO-ARNUNCIO; GILL, 2005; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007) tem mostrado que populações espacialmente "isoladas" podem estar conectadas geneticamente por meio da dispersão de pólen e sementes. Para espécies com dispersão ou polinização pelo vento, a diminuição da densidade vegetal dos plantios florestais e a abertura estradas e aceiros pode aumentar ainda mais o alcance da dispersão.

## CONCLUSÕES

As sementes amostradas nos remanescentes inseridos em meio aos plantios florestais apresentaram em geral menores índices de diversidade genética e maiores índices de fixação. Os resultados demonstram que há indícios de que o florestamento entre os capões tende a reduzir o fluxo de pólen, entretanto, são necessários acompanhamentos de várias estações de reprodução para confirmação desse fato. De qualquer forma, sugere-se que estes capões representam importantes repositórios de diversidade da espécie *Araucaria angustifolia* e sua manutenção se concretiza como uma forma de conservação *in situ* complementar a de áreas protegidas, contribuindo para manutenção dos recursos genéticos da espécie. No entanto, ações no sentido compreender como o manejo da paisagem pode proporcionar maior fluxo gênico e manter níveis adequados de diversidade genética nas gerações futuras são essenciais para conservação dessas populações remanescentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULER, N. M. F.; REIS, M. S.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 329-338, 2002.

BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHÜLER, L.; PILLAR, V. P. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio, In: PILLAR, V. P.; MÜLLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009. p. 13-24.

BEHLING, H., PILLAR, V. D. P., ORLÓCI, L.; BAUERMANN, S. G. Late Quaternary *Araucaria* forest, grassland ("campos"), fire and climate dynamics, studied by high resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, California, v. 203, n. 3, p. 277-297, fev. 2004.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 5, n. 4, p. 573-582, out. 2009.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, n. 6, p. 580-591, out. 2007.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 11, n. 3 p. 179-192, ago. 2004.

CARVALHO, M. M. X. **O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu: uma história de riqueza madeireira e colonizações**. 2010. 313 p. Dissertação (Mestrado em História) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CONTE, R.; REIS, M. S.; MANTOVANI, A.; VENCOSKY, R. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. **Journal of Heredity**, London, v. 99, n. 5, p. 476-482, jun. 2008



- CRISTOFOLINI, C. **Dinâmica da diversidade genética de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze em paisagem de campo no estado de Santa Catarina** 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, n. 3, p. 250–259, mar. 1994.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Palo Alto, v. 34, p. 487–515, ago. 2003.
- GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, n. 5, p. 1631–1643, fev. 2010.
- GOUDET, J. Fstat. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, London, v. 86, n. 6, p. 485–486, 1995.
- GOUDET, J. **FSTAT version 2.9.3.2**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne: Institute of Ecology, 2002. Disponível em: . Acesso em: 20 ago. 2013.
- HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**. Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 323–335, ago. 2004.
- KATTLE, J. C.; HOLLINGSWORTH, M.; JAFFRE, T.; MORAN, B.; ENNOS, A. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 17, p. 3581–3591, jul. 2007.
- KLAUBERG, C.; PALUDO, G. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Florística e estrutura de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista no Planalto Catarinense. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 35-47, mar. 2010.
- KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro-brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, v. 12, n. 12, p. 17-48, 1960.
- KRAMER, A. T.; ISON, J.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Boston, v. 22, n. 4, p. 878-885, ago. 2008.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **GDA-Genetic data analysis**: Computer program for the analysis of allelic data, version 1.0 (d16c) for windows. Albuquerque: The University of New Mexico. 1999. 39 p.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam v. 18, n. 4, p. 189–197, abr. 2003.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, A. P. C.; REIS, M. S. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, London, v. 97, n. 5, p. 466-472, set. 2006.
- MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. Extração de DNA de tecido de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p.12- 17, 2000.
- NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: Two case studies of Neotropical Canopy trees. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 88, p. 264-276, 1997.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583–590, jul. 1978.
- PATREZE, C. M.; TSAI, S. M. Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 284, n. 2, p. 111-122, jan. 2010.
- PINHEIRO, C. C.; GANADE, G. Influência do microhabitat no processo de predação de sementes em uma área degradada. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 1, p. 20-27, jan. 2009.

- REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense:** Araucariaceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966, 62 p.
- RESENDE, L. C.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetica**, Gif-sur-Yvette, v. 139, n. 9, p. 1159–1168, nov. 2011
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v. 94, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.
- SALGUEIRO, F.; CARON, H.; SOUSA, M. I. F.; KREMER, A.; MARGIS, R. Characterization of nuclear microsatellite loci in South American Araucariaceae species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 256–258, fev. 2005.
- SANT'ANNA, C. S.; SEBBENN, A. M.; KLABUNDE, G. H. E.; BITTENCOURT, R.; NODARI, R. O.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 601–613, jun. 2013.
- SCHMIDT, A. B.; CIAMPI, A. Y.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 340–342, mar. 2007.
- SCOTT, L. J.; SHEPHERD, R.; HENRY, R. J. Characterization of highly conserved microsatellite loci in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 236, p. 115–123, fev. 2003.
- SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p. 134–145, 2011.
- SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 21–38, ago. 2004.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 51, n. 3, p. 309–317, jun. 2003.
- SOUZA, M. I. F.; SALGUEIRO, F.; CARNAVALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D. B.; ALVES-FERREIRA, M.; BITTENCOURT, J. V. M.; MARGIS, R. Patterns of genetic diversity in southern and southeastern *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 3, p. 546–556, jun. 2009.
- STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for the in situ conservation of genetic resources. **Plant Biology**, New York, v. 9, n. 4, p. 516–525, jul. 2007.
- WAYCOTT, M.; WALKER, D. I.; JAMES, S. H. Genetic uniformity in a dioecious sea grass, *Amphibolis antarctica*. **Heredity**, London, v. 76, n. 6, p. 578–58, jun. 1996.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358–1370, nov. 1984.
- YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A. G.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. **Forest conservation genetics: principles and practice**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000, p. 123–134.

Recebido em 07/07/2014  
Aceito para publicação em 24/02/2015